Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.1, Spring 2020, P. 107-118
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، ص. ۱۱۸-۱۰۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله علمی-پژوهشی

بهینه‌سازی محیط‌کشت جهت پینه‌زایی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) و تأثیر عصاره مخمر بر ترکیبات آنتی‌اکسیدان

آزاده صفاریزدی[۱]- علی گنجعلی[۲*]- رضا فرهوش[۳]- منیره چنیانی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۴

چکیده

خرفه، *Portulaca oleracea*، به علت داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فراوان و اسیدهای چرب مهم مانند امگا-۳ و ۶، به‌عنوان گیاهی ارزشمند مورد توجه می‌باشد. در آزمایش اول ریزنمونه‌های حاصل از دانهال‌های استریل (برگ، ساقه و جوانه انتهایی) در محیط‌کشت‌های MS و ½MS حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA در قالب طرح کاملاً تصادفی به منظور توان پینه‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند. صفات مورفولوژیکی پینه‌ها پس از ۵ ماه رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۸/۱۶ ساعت به ترتیب روشنایی و تاریکی، بررسی شد. مشاهدات مؤید تشکیل پینه‌های بادوام، سبزرنگ و دارای بافت فشرده از ریزنمونه‌های ساقه بودند. بیشترین درصد پینه‌زایی، اندازه، وزن‌تر و خشک پینه به محیط‌کشت MS حاوی غلظت توأم ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA تعلق داشت. آزمایش دوم با هدف بررسی عصاره مخمر بر محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پینه‌های حاصل انجام شد. برای این منظور پینه‌های ۲۱ روزه به محیط‌کشت MS دارای تیمار هورمونی منتخب آزمایش اول منتقل و با غلظت‌های صفر، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر تیمار شدند. بیشترین محتوای فنل (۶۶۴/۱۲ میلی‌گرم اسید گالیک در صد گرم وزن خشک)، فلاونوئید (۴۲/۲۵ میلی‌گرم کوئرستین در صد گرم وزن خشک) و FRAP (۷۸۷/۰ میکرو مول آهن در گرم وزن خشک) به پینه‌های تیمار شده با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر تعلق داشت. در این آزمایش حداکثر میزان DPPH IC_{50} (۲/۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به تیمار شاهد اختصاص داشت.

واژه‌های کلیدی: فنل، عصاره مخمر، NAA، BAP، *Portulaca oleracea*

مقدمه

خرفه (*Portulaca oleracea*) گیاهی علفی و متعلق به خانواده Portulacaceae می‌باشد. این گیاه به دلیل داشتن مواد مغذی، ترکیبات آنتی‌اکسیدان فراوان و ترکیبات مؤثره‌ای مانند اسیدهای چرب امگا-۳ و ۶، به‌عنوان غذای قدرتمند[۳] آینده لقب گرفته است (۱۱ و ۲۲). ترکیبات فنلی مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گیاه خرفه می‌باشند (۱۱). بررسی‌ها حاکی از آن است که این ترکیبات به دلیل داشتن ساختار ویژه (حالت هیدروکسیلاسیون حلقه‌های آروماتیک)، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا هستند (۳۹). فلاونوئیدها زیرمجموعه مهمی از ترکیبات فنلی هستند که اعمال متعددی در گیاهان مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بهبود مقاومت در مقابل تنش‌های محیطی را برعهده دارند (۲۰). با توجه به عوارض جانبی ناشی از ترکیباتی که به روش‌های شیمیایی تولید می‌شوند، کشت پینه یکی از راهبردهای مهم برای تولید محصولات طبیعی و متابولیت‌های ثانویه دارویی است (۲۸).

در خصوص کشت بافت، تا به امروز بیش از ۵۰ فرمول برای محیط‌کشت ارائه شده است ولی عموماً از محیط‌کشت موراشیگ[۴] و اسکوگ[۵] (MS) برای اکثر گونه‌های گیاهی استفاده شده است (۱۹). غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نقش اساسی در القای پینه دارند (۶). بررسی‌ها نشان داده است که وجود یک منبع اکسین یا سیتوکینین به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر می‌توانند برای پینه‌زایی مورد استفاده قرار گیرند

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: ganjeali@um.ac.ir
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
DOI: 10.22067/jhorts4.v34i1.80393
3- Power food
4- Murashige
5- Skoog

(۲۳). BAP و NAA به ترتیب نوعی از هورمون‌های سیتوکینین و اکسین هستند که در پژوهش‌های مختلف برای تولید پینه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲).

باتوجه به اهمیت گیاه خرفه از نظر ویژگی‌های غذایی و همچنین کاربرد آن برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی، استفاده از روش‌های مختلف از جمله کشت بافت برای افزایش این ترکیبات، مورد توجه می‌باشد. متأسفانه تاکنون پژوهش‌های اندکی در مورد کشت بافت و القای پینه در خرفه انجام شده است. برای مثال صفدری و کاظمی تبار (۲۰۰۹) نقش هورمون‌های ایندول ۳- بوتیریک اسید (IBA) و BAP را در القای پینه از برگ‌ها، بخش هوایی و دمبرگ گیاه *P. oleracea* گزارش نمودند (۳۰). پیریان و پیری (۲۰۱۴) گزارش کردند که تیمار BAP و 2,4-D موجب تولید پینه از ریشه‌های موئین *P. oleracea* شده است (۲۳). نقش کینتین و 2,4-D در القای پینه از گیاه *P. oleracea* توسط اورایبی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش شد (۲۰). تحقیقات دیگری نیز درزمینه تأثیر انواع تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی سایر گونه‌های *Portulaca* انجام شده است. رانی و همکاران (۲۰۰۷) نقش دو هورمون BAP و 2,4-Dدر القاء پینه‌زایی گیاه *P. grandiflora* Hook. را مشاهده کردند (۲۷). صفدری و کاظمی تبار (۲۰۱۰) نیز بیان داشتند تنظیم‌کننده‌های رشد BAP (غلظت‌های ۵ یا ۱۰ میکرو مول) و NAA (۱۰ میکرو مول) می‌توانند تولید پینه را در گیاه *P. grandiflora* القاء کنند (۳۱).

محرک‌های رشد[1] ترکیباتی با وزن ملکولی پایین هستند که می‌توانند موجب القای پاسخ‌های دفاعی در گیاهان (۲۶) و همچنین تولید انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه شوند (۱۳). مخمرها یوکاریوت‌های تک‌سلولی هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به گونه *Saccharomyces cerevisiae* اشاره کرد (۱۴). تأثیر محرک‌های رشد زیستی بر بیان ژن‌های مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه و درنتیجه سنتز این ترکیبات توسط پژوهشگران متعدد به اثبات رسیده است. برای مثال، افزایش محتوای فنل کل و فلاونوئید کوئرستین در پینه‌های حاصل از جداکشت‌های سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) تحت تیمار عصاره مخمر توسط سبحانی زاده و همکاران (۲۰۱۷) گزارش شده است (۳۵). آراسته فر و همکاران (۲۰۱۴) نیز افزایش محتوای فلاونوئید و آنتوسیانین کل را در دانهال‌های سویا (*Glycine max* L.) تحت تأثیر عصاره مخمر مشاهده کردند (۵). اما تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تأثیر عصاره مخمر بر محتوای ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی گیاه خرفه ارائه نشده است. باتوجه به موارد ذکرشده، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر محیط‌کشت، نوع ریزنمونه و غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد بر ظرفیت پینه‌زایی گیاه خرفه و همچنین تأثیر عصاره مخمر بر محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پینه‌های حاصله انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور خرفه (*P. oleracea*) از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری شد. جهت تهیه دانهال‌های استریل، بذرهای سالم و یکسان خرفه در محیط‌کشت ½MS جامد کشت شدند. برای ضدعفونی، بذرها با آب و صابون شسته شده و در زیر هود لامینار فلو (مدل JTLVC2، Jaltajhiz، ایران) در محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. نمونه‌ها سه مرتبه و هر دفعه به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در هر شیشه حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت، ۱۵ عدد بذر کاشته شده و سپس در فیتوترون آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۸/۱۶ ساعت به ترتیب روشنایی و تاریکی قرار گرفتند.

استقرار پینه

جهت ارزیابی توان پینه‌زایی، ریزنمونه‌های مختلف شامل قطعات برگ، ساقه یک سانتی‌متری فاقد گره و جوانه انتهایی از دانهال‌های استریل تهیه و در دو محیط‌کشت MS و ½MS جامد حاوی سطوح مختلف NAA (۰، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و کاربرد توأم آن‌ها کشت شدند. برای هر تیمار سه تکرار مجزا در نظر گرفته و در هر شیشه حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت، ۷ ریزنمونه قرار داده شد. به دلیل کند بودن رشد پینه‌ها و پرهیز از خشک شدن محیط‌های کشت و ممانعت از کاهش مواد غذایی، بعد از سه ماه، پینه‌ها واکشت و به محیط‌کشت‌های جدید منتقل شدند. پس از گذشت ۵ ماه از کشت اولیه و زمانی که پینه‌ها به اندازه کافی رشد کردند، نمونه‌ها از محیط کشت خارج و صفات مورفولوژیکی شامل رنگ، بافت، اندازه، وزن تر و خشک و درصد پینه‌زایی بررسی شدند. جهت تعیین وزن خشک، پینه‌ها در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۲۴ ساعت) قرار داده شده و سپس وزن خشک نمونه‌ها توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم تعیین شد.

تیمار عصاره مخمر

در مرحله بعد، پینه‌های حاصل از قطعات ساقه رشد یافته در محیط کشت منتخب (محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هرکدام از هورمون‌های NAA و BAP)، به محیط مشابه ولی حاوی

1- Elicitor

غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافتند. سه ماه پس از کشت، پینه‌ها از محیط‌کشت خارج شده و جهت سنجش‌های مورد نظر (محتوای فنل و فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی) در دمای اتاق خشک شدند. جهت عصاره گیری، ۰/۰۵ گرم از پینه‌های پودر شده در ۵ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۲۴ ساعت خیسانده و سپس توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. سپس محلول حاصل جهت تبخیر حلال زیر هود قرار گرفت. پس از خشک شدن کامل حلال، نمونه‌های به دست آمده وزن و جهت بررسی‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شاخص‌های مورد مطالعه

تعیین محتوای فنل کل

تعیین محتوای فنل کل پینه‌ها برمبنای روش سینگلتون و روسی (۱۹۶۵) با برخی تغییرات انجام شد (۳۴). ابتدا یک میلی‌گرم از عصاره به دست آمده در مرحله استخراج در یک میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد حل شد. سپس یک میلی‌لیتر عصاره را به ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین- سیوکالتو ده درصد (حجمی/حجمی)، ۵۰۰ میکرولیتر آب و ۸۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد (وزنی/حجمی) افزوده و پس از دو ساعت قرار گرفتن در دمای محیط، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر (UV-120-02, Shimadzu, Japan) در طول موج ۷۶۵ nm خوانده شد. از اسید گالیک (Sigma Aldrich, USA) جهت رسم منحنی استفاده شده و محتوای فنل کل به صورت میلی‌گرم اسید گالیک (GAE) در صد گرم وزن خشک پینه بیان گردید.

تعیین محتوای فلاونوئید کل

جهت تعیین محتوای فلاونوئید کل، یک گرم عصاره به دست آمده در مرحله استخراج در ۱/۵ میلی‌لیتر متانل ۸۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر $AlCl_3$ ده درصد (وزنی/حجمی) آبی، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار آبی و ۲/۸ میلی‌لیتر آب حل و پس از ۳۰ دقیقه، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر (UV-120-02, Shimadzu, Japan) در طول موج ۴۱۵ nm مورد سنجش قرار گرفت. از سطوح مختلف کوئرستین (Sigma Aldrich, USA) برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شده و محتوای فلاونوئید کل به صورت میلی‌گرم کوئرستین (QE) در صد گرم وزن خشک پینه گزارش شد (۸).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس آزمون DPPH

فعالیت روبندگی رادیکال‌های آزاد عصاره به روش DPPH براساس روش براند-ویلیامز و همکاران (۱۹۹۵) با تغییرات اندک سنجش شد. در این روش توانایی انتقال اتم هیدروژن یا الکترون توسط عصاره‌های موجود، از روی میزان تغییر رنگ محلول سنجیده می‌شود (۷). محلول‌های متانلی نمونه در سطوح مختلف غلظت (۰/۱۵۶-۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۱/۷۵ میلی‌لیتر محلول DPPH (۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و شرایط تاریکی قرار داده شدند. متانول مطلق برای صفر کردن دستگاه و نمونه حاوی متانل مطلق و DPPH به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس جذب آن‌ها توسط اسپکتروفتومتر (UV-120-02, Shimadzu, Japan) در طول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله شماره (۱) محاسبه و در انتها نتایج به صورت IC_{50} (مقداری از آنتی‌اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید. طبیعی است هر چه مقدار IC_{50} کوچکتر باشد، فعالیت آنتی‌اکسیدان بیشتر است.

(۱) ۱۰۰ × (جذب شاهد / جذب نمونه- جذب شاهد) = درصد مهار

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس آزمون FRAP

در این روش توانایی عصاره در احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها اندازه‌گیری می‌شود. برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی FRAP، معرف FRAP ازطریق مخلوط کردن ۱۰ میلی‌لیتر بافر استات ۳۰۰ میلی مولار در pH ۳/۶ (۳/۱ گرم استات سدیم سه آبه)، یک میلی‌لیتر کلرید فریک ۷ آبه ۲۰ میلی مولار محلول در آب مقطر و یک میلی‌لیتر ۲،۴،۶-تری-(۲-پیریدیل)-s-تریوزین (TPTZ) ۱۰ میلی مولار (محلول در HCl ۴۰ میلی مولار) بدست آمد. ۱۰ میکرولیتر عصاره (یک گرم در میلی‌لیتر) به ۱۹۰ میکرولیتر محلول FRAP افزوده شده و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب مخلوط به‌وسیله اسپکتروفتومتر (UV-120-02, Shimadzu, Japan) در طول موج ۵۹۳ nm خوانده شد. بلانک شامل ۱۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۹۰ میکرولیتر محلول FRAP بود (۳۸). از غلظت‌های مختلف $FeSO_4 7H_2O$ برای رسم منحنی استاندارد استفاده شده و داده‌های مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی FRAP به صورت میکرو مول Fe در گرم وزن خشک پینه به ثبت رسیدند.

واکاوی آماری

داده‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲، تجزیه واریانس شده و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $p \leq 0.05$ مقایسه شدند.

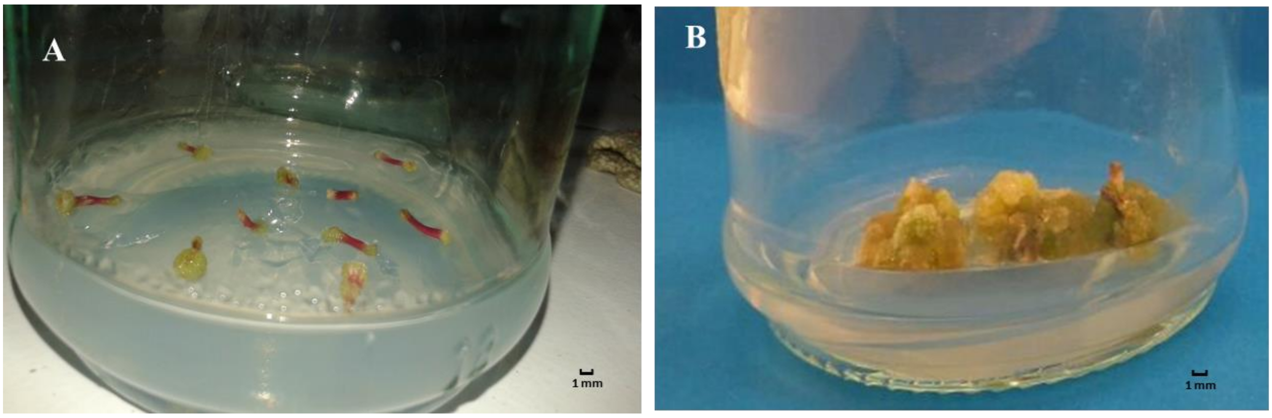
نتایج و بحث

تولید دانهال‌های استریل در محیط‌کشت ½MS

کشت بذر خرفه در محیط‌کشت ½MS منجر به تشکیل دانهال‌های استریل با رشد مناسب و دارای جوانه انتهایی، برگ و ساقه شد. به نظر می‌رسد ذخایر بذر در گیاه خرفه از توانایی لازم برای رشد دانهال و تأمین انرژی لازم تا رشد اتوتروفی گیاه برخوردار است. همسو با نتایج حاضر، تحقیقات انجام شده توسط سایر پژوهشگران نشان داده است که کشت بذر گیاهان به‌منظور جوانه‌زنی نیازی به مواد غذایی با غلظت بالا ندارد و در محیط‌کشت با غلظت کم MS و اکسیژن‌رسانی به خوبی انجام می‌شود (۲۳).

تأثیر ریزنمونه، محیط‌کشت و تیمار هورمونی بر القای پینه‌زایی و رنگ و بافت پینه‌های حاصل از قطعات ساقه

بررسی داده‌ها نشان داد که نوع ریزنمونه، محیط‌کشت و هورمون‌ها تأثیر معنی‌داری بر القای پینه‌زایی داشتند (جدول ۱). نتایج مشاهدات حاکی از آن بود که ریزنمونه‌های برگ و جوانه انتهایی منجر به تولید پینه نشده و چنانچه پینه‌ای نیز تشکیل شد، ظرف چند روز، رشد آن متوقف و نکروزه شدند. تنها ریزنمونه‌های حاصل از قطعات ساقه در محیط‌کشت‌های MS و ½MS حاوی سطوح مشخصی از BAP و NAA، رشد نموده و پینه تشکیل دادند. کاربرد توأم هورمون‌های BAP و NAA در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، پینه‌های نوپدید به رنگ زرد ایجاد کردند (شکل ۱) که پس از گذشت دو ماه، رنگ آن‌ها به سبز لجنی تا سبز تیره تغییر پیدا کرد. رنگ سبز در بین تیمارهای مختلف هورمونی تغییری نداشت و بافت پینه نیز سفت و به هم فشرده بود (شکل ۲).

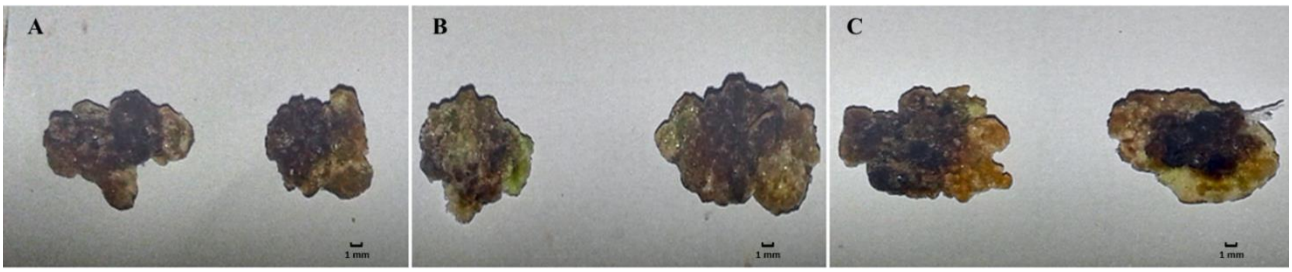


شکل ۱- تأثیر کاربرد توام هورمون‌های BAP و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS بر تشکیل پینه در گیاه خرفه

A) ۳ هفته پس از کشت؛ B) ۱۱ هفته پس از کشت

Figure 1- Effect of 0.5 mg L^{-1} BAP with 0.5 mg L^{-1} NAA in MS medium on callogenesis of Purslane

A) 3 weeks after culture; B) 11 weeks after culture



شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف BAP و NAA بر اندازه پینه‌های گیاه خرفه

A) از سمت چپ: کاربرد توام هورمون‌های BAP و NAA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS و ½MS؛ B) از سمت چپ: کاربرد توام هورمون‌های BAP و NAA در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر در محیط ½MS و در محیط کشت MS؛ C) از سمت چپ: کاربرد توام هورمون‌های BAP و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت ½MS و MS.

Figure 2- The effect of different concentrations of NAA and BAP on callus size of Purslane

A) from the left: 0.1 mg L^{-1} BAP with 0.1 mg L^{-1} NAA in MS and ½MS media; B) from the left: 0.3 mg L^{-1} BAP with 0.3 mg L^{-1} NAA in ½MS and MS media; C) from the left: 0.5 mg L^{-1} BAP with 0.5 mg L^{-1} NAA in ½MS and MS media.

تشکیل پینه به گونه گیاهی، ترکیب هورمونی، وجود هورمون‌های درون‌زاد در هر ریزنمونه، مرحله نمو، سن گیاه مادری و نوع ریزنمونه وابسته است (۱۵)، اگرچه علت وابسته بودن رشد پینه در یک گونه گیاهی به نوع ریزنمونه آن گیاه، هنوز به درستی مشخص نشده است (۱۸). بنابراین انتخاب ریزنمونه نیز تا حد زیادی وابسته به نوع گونه گیاهی می‌باشد. انتخاب ریزنمونه مناسب در مرحله رشد مطلوب به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تأثیر چشمگیری بر القای پینه دارد (۱۶). اکسین و سیتوکینین به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، عوامل کلیدی برای کنترل تقسیم سلولی در شرایط درون شیشه می‌باشند (۱۷). براساس نتایج پژوهشگران، حضور اکسین برای فعال‌سازی تقسیم سلولی در سلول‌های گیاهی تمایزیافته در شرایط کشت بافت مورد نیاز است (۲۵). آلاگومانیان و همکاران (۲۰۰۴) نیز طی پژوهشی بیان نمودند که هورمون BAP علاوه بر القای بهتر پینه‌زایی موجب تکثیر پینه‌ها نیز می‌شود (۳). در برخی تحقیقات گزارش شده است القای پینه از طریق کاربرد هورمون‌های اکسین یا سیتوکینین انجام می‌شود. اما در برخی دیگر، کاربرد توأم این دو هورمون جهت پینه‌زایی توصیه شده است (۲۳). پژوهش‌های اندکی در مورد تأثیر محیط‌کشت و نوع تیمار هورمونی بر پینه‌زایی گیاه *P. oleracea* انجام شده است. اغلب پژوهش‌های انجام شده نمایانگر نیاز به حضور هردو تنظیم‌کننده رشد (اکسین و سیتوکینین) برای القای پینه است که با نتایج پژوهش حاضر هم راستا می‌باشد. زنیکس و همکاران (۲۰۰۸) محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و یا محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر NAA را جهت القای پینه از برگ‌های *P. oleracea* پیشنهاد نمودند (۴۰). صفدری و کاظمی تبار (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که محیط‌کشت حاوی ۱۰ میکرو مول IBA و ۵ یا ۱۰ میکرو مول BAP جهت القای پینه از برگ خرفه مناسب می‌باشد (۲۹). پیریان و پیری (۲۰۱۴) دریافتند که تیمار BAP و 2,4-D در محیط‌کشت MS موجب تولید پینه از ریشه‌های موئین *P. oleracea* می‌شود. در این آزمایش بهترین تیمار ازنظر تولید پینه، تیمار توأم BAP و 2,4-D (هریک در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر) بود. پینه‌های تولیدشده توسط این پژوهشگران، سبز رنگ و دارای بافتی سفت بود که همسو با مشاهدات این پژوهش می‌باشد. وجود پینه‌های سبز رنگ می‌تواند به علت تشکیل کلروپلاستید در سلول‌های بافت پینه باشد که تحت شرایط نور به سرعت تبدیل به کلروپلاست می‌شوند (۲۳). سفت بودن بافت پینه‌ها نیز احتمالاً به علت وجود مقادیر زیادی لیگنین در دیواره آن‌ها می‌باشد (۱۲).

تأثیر ریزنمونه، محیط‌کشت و تیمار هورمونی بر اندازه، وزن تر و خشک پینه‌های حاصل از قطعات ساقه و درصد پینه‌زایی

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که نوع محیط‌کشت (MS و ½MS) و تیمارهای هورمونی (BAP و NAA) و برهمکنش بین دو هورمون تأثیر معنی‌داری بر اندازه پینه‌های حاصل از قطعات ساقه‌های گیاه خرفه داشتند، اما برهمکنش نوع محیط‌کشت و هورمون معنی‌دار نبود ($p≤0.05$). حداکثر اندازه پینه به محیط‌کشت MS حاوی کاربرد توأم هورمون‌های BAP و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تعلق داشت (۲/۱۶ سانتی‌متر) که نسبت به محیط‌کشت ½MS حاوی غلظت مشابهی از BAP و NAA، افزایش معنی‌داری نشان داد. غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به کار رفته در دو نوع محیط‌کشت MS و ½MS موجب کاهش معنی‌دار اندازه پینه نسبت به کاربرد توأم ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و NAA شد. اندازه پینه‌های به دست آمده از محیط‌کشت‌های MS و ½MS حاوی ترکیبی از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA نیز نسبت به غلظت‌های ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و همچنین تلفیقی از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به صورت معنی‌داری کاهش یافت. نتایج نشان داد با کاهش غلظت هورمون‌ها در محیط‌کشت، اندازه پینه‌ها نیز کاهش یافت، به‌گونه‌ای که کمترین مقدار پینه به محیط ½MS فاقد تیمار هورمونی مربوط بود که هیچ پینه‌ای تولید نکرد (جدول ۱).

بررسی نتایج مؤید آن است که محیط‌کشت و تیمارهای هورمونی BAP و NAA، تأثیر معنی‌داری ($p≤0.05$) بر وزن تر پینه داشتند، اما تأثیر برهمکنش محیط‌کشت و هورمون بر این صفت معنی‌دار نبود. بیشترین وزن تر پینه به کاربرد توأم هورمون‌های BAP و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و محیط‌کشت MS تعلق داشت (۱/۸۲ گرم) که افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. کمترین وزن تر پینه در محیط‌کشت ½MS فاقد هورمون مشاهده شد. با کاهش غلظت هورمون‌ها، غالباً وزن تر پینه در دو محیط کشت به صورت معنی‌داری کاهش یافت، همچنین در این آزمایش در اغلب ترکیبات هورمونی، وزن تر پینه در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت ½MS بیشتر بود (جدول ۱).

نتایج حاصل از تأثیر محیط‌های کشت MS و ½MS و تیمارهای مختلف BAP و NAA بر وزن خشک پینه مؤید عدم تأثیر معنی‌دار محیط‌کشت و برهمکنش محیط‌کشت و هورمون بر وزن خشک پینه‌ها می‌باشد ($p≤0.05$). بیشترین وزن خشک پینه به کاربرد توأم هورمون‌های BAP و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در هردو

محیط‌کشت MS (۷۵/۳۳ میلی‌گرم) و ½MS (۶۵/۶۶ میلی‌گرم) و کمترین وزن خشک پینه به محیط‌کشت ½MS فاقد هورمون مربوط بود (جدول ۱). محیط‌کشت‌های MS و ½MS و تیمارهای مختلف هورمونی (BAP و NAA) تأثیر معنی‌داری بر درصد پینه‌زایی ریز نمونه‌های ساقه داشتند، اما تأثیر برهمکنش هورمون و محیط‌کشت از این لحاظ معنی‌دار نبود ($p\leq 0.05$). در هر دو محیط کشت، بیشترین درصد پینه‌زایی در مورد کاربرد توأم هورمون‌های BAP و NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت (جدول ۱).

تا به امروز، پژوهش‌های اندکی پیرامون پینه‌زایی گونه *P. oleracea* انجام شده است. اورایبی و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر سطوح مختلف دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D و کینتین بر پینه‌زایی گیاه خرفه را بررسی کردند. نتایج نشان‌دهنده افزایش القای پینه، وزن تر و خشک پینه‌ها در تیمار توأم ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D یا ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین نسبت به شاهد بود (۲۰). در مورد تأثیر تیمارهای مختلف هورمونی بر میزان پینه‌زایی سایر گونه‌های جنس *Portulaca* نیز گزارش‌های اندکی وجود دارد. برای مثال مشاهده شده است که سطوح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D موجب پینه‌زایی گیاه *P. grandiflora* می‌شود (۲۷). همچنین براساس نتایج صفدری و کاظمی تبار (۲۰۱۰)، غلظت‌های ۵ یا ۱۰ میکرو مول BAP و ۱۰ میکرو مول NAA در محیط‌کشت MS موجب القای پینه از برگ‌های گونه *P. grandiflora* شدند (۳۰).

جدول ۱- اثرات متقابل محیط‌کشت و هورمون بر اندازه پینه، وزن تر ، خشک و درصد پینه‌زایی قطعات ساقه گیاه خرفه

Table 1- Intermediate effects of culture type and hormone treatments on callus size, fresh and dry weight, and percentage of calluses derived from stem specimen of Purslane

محیط‌کشت Medium	NAA ($mg\ L^{-1}$)	BAP ($mg\ L^{-1}$)	درصد پینه‌زایی Callogenesis percentage	وزن خشک پینه Dry weight of callus (mg)	وزن تر پینه Fresh weight of callus (mg)	اندازه پینه Callus size (mm)
MS	0	0	4.76de	0.00c	0.0l	0.1ij
	0	0.1	4.7de	0.33c	23.3l	0.1ij
	0	0.3	4.76de	0.46c	50.0kl	0.3h-j
	0	0.5	9.52c-e	1.13c	156.6h-l	0.8g-j
	0.1	0	4.76de	0.05c	0.0l	0.1ij
	0.1	0.1	19.02cd	6.23c	636.6d	7.1d
	0.1	0.3	23.76c	2.16c	243.3f-j	3.ef
	0.1	0.5	23.76c	3.00c	302.0e-i	2.8e-g
	0.3	0	9.52c-e	0.33c	3.3kl	0.0g-j
	0.3	0.1	19.02cd	3.10c	343.3e-g	3.1ef
	0.3	0.3	23.76c	55.33b	1243.3c	15.6c
	0.3	0.5	23.76c	3.40c	386.6ef	3.3ef
	0.5	0	19.02cd	1.56c	176.6g-l	1.1f-j
	0.5	0.1	23.76c	3.06c	320.0e-h	2.3e-i
	0.5	0.3	23.76c	3.70c	406.6ef	3.3ef
	0.5	0.5	90.46a	75.33a	1826.5a	21.6a
½M	0	0	0.00e	0.0c	0.0l	0.0j
	0	0.1	4.76de	0.33c	13.3l	0.1ij
	0	0.3	4.76de	0.46c	56.6kl	0.3h-j
	0	0.5	9.52c-e	1.13c	150.0h-l	0.8g-j
	0.1	0	4.76de	0.03c	3.3l	0.1ij
	0.1	0.1	14.28c-e	4.53c	450.0e	6.0d
	0.1	0.3	19.02cd	2.03c	223.3f-k	2.0e-j
	0.1	0.5	19.02cd	2.73c	290.0e-i	2.5e-h
	0.3	0	4.76de	0.33c	46.6kl	0.3h-j
	0.3	0.1	14.28c-e	2.90c	313.3e-i	2.3e-i
	0.3	0.3	19.02cd	55.66b	1193.3c	15.0c
	0.3	0.5	23.76c	3.36c	386.6ef	3.5e
	0.5	0	9.52c-e	1.06c	126.6i-l	0.6g-j
	0.5	0.1	19.02cd	2.80c	310.0e-i	2.6e-h
	0.5	0.3	23.76c	3.30c	360.0e-g	2.8e-g
	0.5	0.5	76.16b	65.66a	1617.0b	17.6b

میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حروف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by at least one similar letter are not significantly different ($p\leq 0.05$), based on Duncan’s multiple range test.

تأثیر سطوح مختلف عصاره مخمر بر محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل پینه‌ها

سطوح مختلف عصاره مخمر تأثیر معنی‌داری بر محتوای فنل کل پینه‌ها داشتند ($p \leq 0.05$)، به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت عصاره مخمر در محیط‌کشت، میزان ترکیبات فنلی افزایش یافت. غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر از نظر افزایش محتوای فنل پینه‌ها مشابه بودند، اما کاربرد هر دو غلظت محتوای فنل کل را نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری افزایش داد. در این آزمایش بیشترین افزایش ترکیبات فنلی در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر (۶۶۴/۱۲ میلی‌گرم اسید گالیک در صد گرم وزن خشک) مشاهده گردید که تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی داده‌ها مؤید این است که با افزایش غلظت عصاره مخمر، محتوای فلاونوئید کل به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.05$). افزایش مقدار فلاونوئید کل در تمام سطوح به جز ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر، نسبت به شاهد معنی‌دار بود. بیشترین محتوای ترکیبات فلاونوئیدی به غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۴۲/۲۵ میلی‌گرم کوئرستین در صدگرم وزن خشک) مربوط بود و کمترین آن به تیمار شاهد تعلق داشت. به‌طورکلی، افزایش حدود ۱/۴ برابری در محتوای فنل و فلاونوئید پینه‌های تحت تأثیر ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۲).

عصاره مخمر *S. cerevisiae* به‌عنوان یک محرک رشد زیستی شناخته شده و ترکیبی از اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، مواد معدنی و ترکیبات ناشناخته می‌باشد (۲۴). اثرات حاصل از عصاره مخمر به حضور ترکیباتی نسبت داده می‌شود که هنوز به درستی شناخته نشده است (۵). از عصاره نامبرده جهت القاء و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند گیاهی استفاده می‌شود (۱۰). همسو با پژوهش حاضر، سبحانی زاده و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر عصاره مخمر را بر افزایش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی پینه‌های گیاه سیاه‌دانه گزارش کردند (۳۵). آراسته فر و همکاران (۲۰۱۴) افزایش محتوای فلاونوئید و آنتوسیانین را در دانهال‌های سویای تحت تیمار عصاره مخمر تأیید نمودند (۵). در پژوهشی دیگر، تیمار عصاره مخمر در گیاهان بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) منجر به افزایش محتوای رزمارینیک اسید (ترکیب فنلی) شد (۲۹). محرک‌های رشد ممکن است ازطریق تغییر و تنظیم میزان تجمع یا تبادل مواد ذخیره‌شده در واکوئل سلول‌های گیاه و تبدیل یا تجزیه متابولیت‌های ثانویه، محتوای آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۳۵). پژوهشگران براین باورند که عصاره مخمر ازطریق فعال کردن آنزیم‌های مسیر سنتز فلاونوئیدها، منجر به افزایش ترکیبات مذکور می‌شود (۳۲). برخی محققان نیز بر تأثیر عصاره مخمر بر کل مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها تأکید دارند (۲۹). افزایش بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز (۳۳) و ایزوفلاون سینتاز (آنزیم‌های مسیر سنتز ترکیبات فنلی) از علل احتمالی افزایش ترکیبات فلاونوئیدی تحت تأثیر عصاره مخمر عنوان شده است (۵). تصور می‌شود ایجاد تنش و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر تحت تأثیر عصاره مخمر، احتمالاً منجر به القای سنتز جاسمونیک اسید شده و درنتیجه بیان برخی ژن‌های دفاعی و سنتزی متابولیت‌های ثانویه (مانند ترکیبات فنلی) را افزایش می‌دهد (۲۹). بررسی‌ها نشان داده است ترکیبات فنلی نقش مهمی در حفاظت گیاهان در برابر عوامل تنش‌زای زنده و غیرزنده دارند. آن‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی وسیعی مانند اثرات ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدالتهابی از خود نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد افزایش محتوای فلاونوئید پاسخی برای کاهش اثرات تنش حاصل از محرک‌های رشد می‌باشد (۵).

تأثیر سطوح مختلف عصاره مخمر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پینه‌ها براساس آزمون DPPH و FRAP

بررسی داده‌ها حاکی از تأثیر معنی‌دار سطوح مختلف عصاره مخمر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پینه‌ها می‌باشد ($p \leq 0.05$). با افزایش غلظت عصاره مخمر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پینه‌ها افزایش چشمگیری نسبت به شاهد داشت. کاهش معنی‌دار مقادیر DPPH IC_{50} با افزایش غلظت عصاره مخمر مشاهده شده است. این کاهش در غلظت ۲۵۰ (۲/۰۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و همچنین ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱/۸۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار بود. مقدار IC_{50} DPPH در پینه‌های شاهد (بیشترین میزان DPPH IC_{50})، ۱/۳ برابر نمونه‌های تیمارشده با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر (کمترین میزان DPPH IC_{50}) بود (جدول ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات حاکی از تأثیر معنی‌دار کاربرد عصاره مخمر بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پینه‌ها براساس آزمون FRAP می‌باشد ($p \leq 0.05$). افزایش مقدار FRAP در تمامی غلظت‌های مورد استفاده عصاره مخمر نسبت به شاهد معنی‌دار بود. در این آزمایش با افزایش غلظت عصاره، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پینه‌ها براساس آزمون FRAP به صورت معنی‌داری نسبت به یکدیگر و نسبت به شاهد افزایش یافت. بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به کاربرد غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۷۸۷/۰ میکرو مول آهن در گرم وزن خشک) تعلق داشت که نسبت به کمترین مقدار FRAP در تیمار شاهد (۵۶۸/۶ میکرو مول آهن در گرم وزن خشک) حدوداً ۱/۴ برابر بیشتر بود (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر بر محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پینه خرفه براساس آزمون DPPH و FRAP

Table 2- The effect of different concentrations of yeast extract on total phenol, flavonoid content, and antioxidant capacity of Purslane calluses based on DPPH and FRAP

غلظت‌های عصاره مخمر Concentrations of yeast extract (mg L^{-1})	FRAP (µmol Fe g^{-1} DW)	DPPH IC^{50} (mg ml^{-1})	فلاونوئید کل Total flavonoid (mg QE $100g^{-1}$ DW)	فنل کل Total phenol (mg GAE $100g^{-1}$ DW)
0	568.6d	2.45a	30.29c	483.21c
125	649.0c	2.37a	32.03c	553.07 b
250	698.3b	2.08b	38.06b	589.68b
500	787.0a	1.85b	42.25a	664.12a

میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حروف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by at least one similar letter are not significantly different ($p\leq 0.05$), based on Duncan’s multiple range test.

زلوتک (۲۰۱۷) افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*) را در پاسخ به تیمار عصاره مخمر گزارش نمود (۴۱). براساس گزارش زلوتک و اسویسا (۲۰۱۵)، قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان کاهو (*Lactuca sativa*) در پاسخ به تیمار عصاره مخمر افزایش یافت (۴۲). آبراهام و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی براساس آزمون DPPH را در دانهال‌های *Curcuma manga* Roxb. تحت تأثیر عصاره مخمر گزارش کردند (۱). علیزاده و همکاران (۲۰۱۵) و همچنین آبراهام و همکاران (۲۰۱۱)، معتقدند رابطه مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان وجود دارد (۴،۱). طبق گفته چوایب و همکاران (۲۰۱۲)، با افزایش محتوای فنل کل در گیاهان، قدرت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد (۹). بررسی‌ها نشان داده است که فنل‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به ویتامین‌ها و کاروتنوئیدها در محیط این‌ویترو دارند. خنثی کردن اکسیژن یکتایی و سه تایی و تجزیه پراکسید از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی گزارش شده توسط ترکیبات فنلی است (۳۶). تصور می‌شود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فنل‌ها وابسته به حالت هیدروکسیلاسیون حلقه آروماتیک آن‌ها می‌باشد (۳۷). چون ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در سیتوسل حضور دارند، اعتقاد بر این است که این ترکیبات روبنده گونه‌های اکسیژن واکنشگر بوده و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند (۳۹). بنابراین می‌توان عنوان نمود که علت اصلی افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پینه‌ها، افزایش ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدها در پاسخ به تیمار عصاره مخمر می‌باشد (۱).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد محیط‌کشت ½MS برای تولید دانهال‌های استریل از بذور گیاه خرفه مناسب می‌باشد. کاربرد همزمان هورمون‌های BAP و NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌کشت MS بهترین تیمار برای تولید پینه‌های حاصل از قطعات ساقه بود. بیشترین مقدار وزن تر ، اندازه و تعداد پینه در هر واحد آزمایشی از ویژگی‌های این تیمار بود، اما برای داشتن پینه‌های با وزن خشک بیشتر می‌توان از تیمار توأم ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های NAA و BAP در هر دو محیط‌کشت MS و ½MS استفاده کرد. با کاهش غلظت هورمون‌های NAA و BAP، تولید پینه و صفاتی مانند وزن تر و خشک پینه به صورت معنی‌داری کاهش یافت. در این آزمایش قطعات یک سانتی‌متری ساقه گیاه به‌عنوان بهترین ریزنمونه جهت پینه‌زایی گیاه مذکور تعیین شد. پینه‌های ایجادشده در تیمارهای مختلف، ازنظر رنگ و بافت یکسان و عمدتاً به رنگ سبز تیره بودند. افزایش کاربرد عصاره مخمر، محتوای ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پینه‌ها را افزایش داد. در این بررسی کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر، مؤثرترین تیمار از نظر بهبود ترکیبات مؤثره و فعالیت آنتی‌اکسیدان در پینه‌های گیاه خرفه بود.

منابع

1- Abraham F., Bhatt A., Keng C.L., Indrayanto G., and Sulaiman S.F. 2011. Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of *Curcuma mangga in vitro* plantlets. African Journal of Biotechnology 10(40): 7787-7795.

2- Agrawal S., Chandra N., and Kothari S.L. 1989. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. *mathania*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16: 47-55.

3- Alagumanian S., Perumal V.S., Balachandar R., Rameshkannan K. and Rao M.V. 2004. Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. Current Science 86(4): 1478-1480.

4- Alizadeh A. 2015. Essential oil composition, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activity of cultivated

Satureja rechingeri Jamzad at different phenological stages. Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences 70(3-4): 51-58.

5- Arastefar A., Riahi-Madvar A., Tohid Far M., and Yousefi K. 2014. Investigation of the effects of yeast extract on isoflavone synthase gene expression and some biochemical parameters in *Glycine max* seedlings. Agricultural Biotechnology Journal 5(3): 1-18. (In Persian with English abstract)

6- Bajaj Y., Furmanowa P.S., and Olszowska O. 1998. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. Medicinal and Aromatic Plants 60-103.

7- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology 28(1): 25-30.

8- Chang C-C., Yang M-H., Wen H-M., and Chern J-C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal Food and Drug Analysis 10(3): 178-182.

9- Chouaieb H., Ayadi I., Zouari S., Fakhfakh N., Zaidi S., and Zouari N. 2012. Effect of phenological stage and geographical location on antioxidant activities of Tunisian horehound: *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). Journal of Biologically Active Products from Nature 2(4): 232-238.

10- Darvishi A., Kahrizi D., Bahraminezhad S., and Mansouri M. 2017. Study of yeast extract and salicylic acid elicitors effects on percentage of cell survival and the amount of beta-caryophyllene and isopulegone secondary metabolites in Pennyroyal (*Mentha pulegium*) cell culture. Cellular and Molecular Researches 29: 370-381. (In Persian with English abstract)

11- El-Aziz H.A.A., Sobhy M.H., Kawkab A.A., Azza K.A.E.H., Zeinab A.R., and Wedad A.H. 2014. Chemical and remedial effects of purslane. Life Science Journal 11: 31-42.

12- Elyasi L., Mehrabi A-A., Seyedi M., and Safari Z. 2016. Optimization of callus culture of *Bachtiarica satureja* L. using different explants and concentrations of growth regulator. Journal of Crop Breeding 8(20): 124-132. (In Persian with English abstract)

13- Esmaeilzadeh Bahabadi S., and Sharifi M. 2013. Physiologic responses of suspension-cultured *Linum album* Kotschy ex Boiss. Cell to fungal elicitors. Iranian Journal of Plant Biology 5(17): 1-30. (In Persian with English abstract)

14- Gholampour Azizi I., Gorji M., Nouri B., and Rouhi S. 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in reducing of the amount of Citrinin fungal toxin in wheat flour. Hakim Jorjani Journal 2(2): 25-32. (In Persian with English abstract)

15- Hosseini B., Salimi A., and Sharafi A. 2015. A survey of the effect of explants type, plant growth regulators and activated charcoal on callus induction in *Papaver bracteatum*. Iranian Journal of Plant Biology 25: 29-42. (In Persian with English abstract)

16- Khawar K.M., Sarihan E.O., Sevimay C.S.S., and Özcan S. 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Periodicum Biologorum 107: 113-116.

17- Khorrami Raad M., Bohluli Zanjani S., Ramezani Sayyad A., Maghsudi M., and Kaviani B. 2012. Effect of cultivar, type and age of explants, light conditions and plant growth regulators on callus formation of anthurium. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 12(6): 706-712.

18- Magyar-Tabori K., Dobranszki J., Teixeira da Silva J.A., Bulley S.M., and Hudák I. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 251-267.

19- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-97.

20- Oraibi A.G., AlShammari A.A., Mohsien R.A., and Obaid W.J. 2017. Investigation the antibacterial activity of *Portulaca oleracea* L. tissue cultures *in vitro*. Journal of Pharmaceutical Research International 18(5): 1-7.

21- Panche A.N., Diwan A.D., and Chandra S.R. 2016. Flavonoids: an Overview. Journal of Nutritional Science 5 (47): 1-15.

22- Peksel A., Arisan-Atac I., and Yanardag R. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of purslane (*Portulaca oleracea* subsp. *Sativa L.*). Italian Journal of Food Science 18: 295-308.

23- Pirian K., and Piri K. 2014. Callus induction in hairy roots of *Portulaca oleracea* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 30(2): 231-238. (In Persian with English abstract)

24- Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C. and Giulietti A.M. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme and Microbial Technology 26(2-4): 252-258.

25- Punja Z.K., Abbas N., Sarmento C.G., and Tang F.A. 1990. Regeneration of *Cucumis sativus* vars, sativus and hardwickii, *C. melo* and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21(2): 93-102.

26- Radman R., Saez T., Bucke C., and Keshavarz T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnology and Applied Biochemistry 37: 91-102.

27- Rani N., Joy B., and Emilia Abraham T. 2007. Cell suspension cultures of *Portulaca grandiflora* as potent catalysts for biotransformation of L-tyrosine into L-DOPA, an anti-parkinson's drug. Pharmaceutical Biology 45(1): 48-53.

28- Reis A., Kleinowski A.M., and Schuquel Klein F.R. 2017. Callus induction and betacyanin quantification by HPLC/MS-MS in *Alternanthera brasiliana* L. Kuntze. Hoehnea 44(1): 90-95.

29- Riahi-Madvar A., Yousefi K., and Nasiri-Bezenjani M.A. 2014. Positive effect of Cu and yeast extract elicitors on the content of rosmarinic acid in *Melissa offisinalis* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 30(5): 714-723. (In Persian with English abstract)

30- Safdari Y., and Kazemitabar S.K. 2009. Plant tissue culture study on two different races of purslane (*Portulaca oleracea* L.). African Journal of Biotechnology 8(21): 5906-5912.

31- Safdari Y., and Kazemitabar S.K. 2010. Direct shoot regeneration, callus induction and plant regeneration from callus tissue in Mose Rose (*Portulaca grandiflora* L.). Plant Omics Journal 3(2): 47-51.

32- Savitha B.C., Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., and Ravishankar G.A. 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. Process Biotechnology 41: 50-60.

33- Seidel V., Windhovel J., Eaton G., Alfermann A.W., Arroo R.R.J., Medarde M., Petersen M. and Wolley J.G., 2002. Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. Planta 215: 1013-1039.

34- Singleton V.L., and Rossi J.A. 1965**.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. The American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

35- Sobhanizadeh A., Solouki M., and Bahman Fazeli-Nasab B. 2017. Optimization of callus induction and effects of biological and non-biological elicitors on content of phenol/ flavonoid compounds in *Nigella sativa* under *in-vitro* conditions. Journal of Cell & Tissue 8(2): 165-184.

36- Soengas P., Rodriguez V.M., Velasco P., and Cartea M.E. 2018. Effect of temperature stress on antioxidant defenses in *Brassica oleracea*. ACS Omega 3: 5237-5243.

37- Sroka Z., and Cisowski W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. Food and Chemical Toxicology 41(6): 753-758.

38- Sulaiman S.F., Sajak A.A.B., Ooi K.L., and Seow E.M. 2011. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. Journal of Food Composition and Analysis 24: 506-515.

39- Wahid A., and Ghazanfar A. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. Journal of Plant Physiology 163: 723-730.

40- Zhenxia L.I., Dong W., Chen B., and Xinxiang H. 2008. Study on tissue culture of *Portulaca oleracea* L. Guizhou Agricultural Sciences 3(1):21-27.

41- Złotek U. 2017. Effect of jasmonic acid and yeast extract elicitation on low-molecular antioxidants and antioxidant activity of marjoram (*Origanum majorana* L.). Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 16(4): 371-377.

42- Złotek U., and Świeca M. 2015. Elicitation effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast extract on main health-promoting compounds and antioxidant and anti-inflammatory potential of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). The Journal of the Science of Food and Agriculture 96(7): 2565-2572.

Journal of Horticultural Science
Vol. 34, No.1, Spring 2020, P. 107-118
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، ص. ۱۱۸-۱۰۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Culture Optimization for *In Vitro* Callogenesis in Purslane (*Portulaca oleracea*) and Effect of Yeast Extract on Antioxidant Compounds

A. Saffaryazdi[1]- A. Ganjeali[2]*- R. Farhoosh[3]- M. Cheniany[4]
Received: 13-05-2019
Accepted: 04-03-2020

Introduction: Purslane (*P. oleracea***)** is considered as valuable plant due to its high antioxidant compounds and important fatty acids such as omega-3 and 6. Phenolic and flavonoid compounds are one of the most important constituents in the purslane. Phenolics are a large group of natural plant compounds with antioxidant and Anti-inflammatory properties. Flavonoids, as a subset of phenolic compounds, have a wide range of effects on plants, including antioxidant activity and improve resistance to environmental stresses. Callus culture is one of the important strategies for the production secondary metabolites, which are difficult to produce chemically. Plant growth regulators including auxins and cytokinins play a crucial role in the stages of plant growth. Various combinations of these two hormones are used to make the desired changes in the cultures. Studies suggest that the accumulation of secondary metabolites can be increased by the application of different elicitors in medium. Researchers reported an increase in the content of secondary metabolites such as phenol and flavonoid compounds in calli treated with elicitors such as yeast extract. The purpose of this study was to determine the best explant, medium and hormonal treatment for calli induction of purslane. The effect of different levels of yeast extract on total phenol and flavonoid content and antioxidant capacity of purslane calluses was also investigated.

Materials and Methods: Seeds of purslane plant were cultivated in a solid 1/2MS medium for the preparation of sterile seedlings. The explants from sterile seedlings including to leaves, 1 cm stem specimens and terminal buds, were placed on MS and 1/2MS medium containing 0, 0.1, 0.3, and 0.5 mg L^{-1} BAP and NAA. After five months, calluses were evaluated for callogenesis and some morphological traits such as color, texture, and size, fresh and dry weight**.** This experiment was conducted based on completely randomized design with three replications**.** In the second experiment, the calluses obtained from the previous stage were transferred to MS medium with selected hormone treatment of the first experiment (0.5 mg L^{-1} NAA and BAP) and different levels of yeast extract (0, 125, 250, and 500 mg L^{-1}). Total phenol and flavonoid contents of the calluses were determined by Folin-Ciocalteau and aluminum chloride methods, respectively. Furthermore, Ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assays were used to determine the antioxidant activities.

Results and Discussion: The results showed that 1/2MS medium was suitable for sterile seedling production from purslane seeds. Based on the present study, only stem explants in a medium containing BAP and NAA, produced durable calluses. The color of the resulting calluses were green and had a constant and firm texture. The highest callus percentage (90.46%), the size (21.6 mm), and fresh (1826.5 mg) and dry weight (75.33 mg) of calluses belong to MS medium containing 0.5 mg L^{-1} BAP and NAA. Results of the second experiment showed positive and significant effects of yeast extract on the total phenol, flavonoid contents and antioxidant activities. The highest content of total phenol (664.12 mg GAE $100g^{-1}$ DW), flavonoid (42.25 mg QE $100g^{-1}$ DW) and FRAP data (787 µmol Fe g^{-1} DW) were obtained from the calli treated with 500 mg l^{-1} yeast extract. The maximum DPPH IC_{50} (2.45 mg ml^{-1}) was also observed in control. The formation of callus associated with plant species, hormonal composition, the stage of development, and the type of explants. Auxin and cytokinin as plant growth regulators are key factors for controlling cell division in tissue culture. In most studies, callus formation in purslane plant were induced in medium containing auxin and cytokinin. The presence of green calluses derived from purslane explants can be due to the formation of chloroplastids in the cells of the callus tissue that rapidly produce chloroplasts under light conditions. In the second experiment, increased phenolic and flavonoid compounds with yeast extract treatment probably resulted in increased antioxidant activity.

Conclusion: In the present study, 1/2MS medium is suitable for the production of sterile seedlings from

1, 2 and 4- Ph.D. Student, Associate Professor and Assistant Professor Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: ganjeali@um.ac.ir)
3- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

purslane seeds. MS medium containing 0.5 mg l^{-1} BAP and NAA is the best treatment for calli induction from stem specimens. The concentration of 500 mg L^{-1} of yeast extract is introduced as the most effective concentration for increasing the phenolic and flavonoid content and antioxidant activity in the purslane calluses.

Keywords: BAP, NAA, Phenol, *Portulaca oleracea,* Yeast Extract